

AZT 長期投与後 ddI 投与に切り替えた患者から経時的に 分離された HIV-1 の AZT 感受性

¹⁾神奈川県衛生研究所・ウイルス部

²⁾横浜市立大学医学部・臨床検査部

³⁾神奈川県立こども医療センター・血液科

斎藤 隆行¹⁾ 近藤真規子¹⁾ 伊藤 章²⁾ 長尾 大³⁾
林 孝子¹⁾ 渡邊 寿美¹⁾ 今井 光信¹⁾

(平成6年3月2日受付)

(平成6年3月17日受理)

Key words: AZT, ddI, HIV-1, drug susceptibility,
AZT resistance

要 旨

Azidothymidine (AZT) 長期投与 (12~18カ月) 後 dideoxyinosine (ddI) 投与に切り替えた Human immunodeficiency virus type-1 (HIV) 感染者 3 名から経時的に分離した HIV12 株について, AZT に対する感受性を培養により検討した。

AZT あるいは ddI の投与を開始する以前に分離された HIV 株は, AZT を含む培養液中で増殖は認められなかった。AZT 投与開始後 6 カ月以上経過した時点で分離された HIV 株は, AZT 1.0 μ M を含む培養液中で巨細胞を形成する細胞変性効果 (CPE) が認められ, 培養上清中には ELISA により HIVp24 (p24) 抗原が検出された。

AZT 長期投与後 ddI 投与に切り替えてから分離された 7 株 (ddI 投与 1.5~15カ月経過) のうち 6 株は AZT 1.0 μ M を含む培養液中で CPE が観察され, 培養上清中に p24 抗原が検出された。このように, AZT 長期投与後 ddI に切り替え最長 13 カ月後においてもなお AZT に耐性の HIV 株が優勢に増殖して行くことが確認された。

序 文

現在抗 HIV 剤として azidothymidine (AZT)¹⁾ および dideoxyinosine (ddI)²⁾ が広く使用され, 臨床症状の改善や延命等の効果が確認³⁾⁴⁾ されている。しかしながら, いずれの薬剤も投与による副作用⁵⁾⁶⁾ や, 長期投与による耐性株の出現⁷⁾⁸⁾ が問題となっており, その投与時期や他の抗 HIV 薬剤との併用による対策等が懸案となっている。

前報⁹⁾ で我々は, AZT 投与患者から分離された

HIV の AZT 感受性について報告したが, 今回は, AZT 長期投与後に ddI 投与に切り替えた患者から経時的に分離した HIV の AZT に対する感受性について, 培養により検討した。

材料および方法

1) 対象

Table 1 に示す 3 名の HIV 感染者について検討した。

症例 005: 1990 年 4 月から 1993 年 3 月の間に 8 回分離を試みいずれも成功した。この間 CDC 分類 II から IV-C2 へ移行した。薬剤についてはグリチルリチンの投与から AZT との併用, そして

Table 1 Profile of individuals

Individual	Age	Sex	The mode of transmission	CDC group	Duration of drug therapy (months)	
					AZT	ddI
005	59	F	Heterosexual	II→IV-C2*	12	→ 15**
043	26	F	Unkown	III	18	→ 13
091	16	M	Blood products	IV→C1	14	→ 11

*During the course of the study, 005 was progressed from asymptomatic carrier to AIDS-related complex.

**After long-term therapy with AZT, changed to ddI therapy.

AZT 12カ月投与後 ddI 投与に切り替えられ15カ月が経過した。

症例043：1990年7月から1992年12月の間に5回分離を試みいずれも成功した。初回検体採取時に既に AZT の投与を受け2カ月間が経過していた。その後 AZT 18カ月投与後 ddI 投与に切り替え13カ月が経過した。

症例091：1990年6月から1991年5月の間に3回分離を試みいずれも成功した。初回検体採取時に既に AZT の投与を受け14カ月間が経過していた。その後すぐに ddI 投与に切り替え11カ月が経過した。

これらから分離された HIV の内12株を用い、AZT に対する感受性を培養により検討した。

2) HIV の分離

HIV 分離は既報⁹⁾のとおり予研法で行った。

3) AZT 感受性試験

AZT 0.1 μ M あるいは1.0 μ M を含む培養液でそれぞれ懸濁させた PHA-P 刺激済みの健常人 PBMC (1 \times 10⁶個/ml) を24穴セミマイクロプレートに播き、それぞれのウエルに HIV 分離株の培養上清100 μ l を接種し、培養した。CPE の有無を7日間観察した後、それぞれの培養上清100 μ l を同様に新しい PBMC に継代した。この操作を4回繰り返し、最終培養上清については、ELISA (ダイナボット社) による p24抗原の検出を実施した。

成 績

それぞれの症例より経時的に分離した12株の HIV を、AZT を含む培養液中で培養した結果を Table 2 に、培養4代終了後の上清中の p24抗原量を ELISA により測定した結果を Table 3 に示

Table 2 AZT susceptibility of HIV-1 isolates

HIV-1 isolate	Duration of drug therapy (months)		Concentration of AZT		
	AZT	ddI	0	0.1 μ M	1.0 μ M
005	0	0	##	-	-
005-3	2	0	##	-	-
005-5	12	→ 1.5	##	##	##
005-6	12	→ 6	##	##	##
005-7	12	→ 12	##	##	+
005-8	12	→ 15	##	##	-
043	2	0	##	##	-
043-2	6	0	##	##	##
043-4	18	→ 3	##	##	##
043-5	18	→ 13	##	##	##
091	14	→ 0	##	##	##
091-3	14	→ 11	##	##	##

- Cytopathic effect (CPE) was negative.

+~## CPE was positive

す。最下段の PBMC は、本培養実験に用いた PBMC をそれぞれの培養液中で同様に4代培養したのちの上清の吸光度を示す。

症例043：AZT 投与開始後2カ月の時点での分離株043は、AZT 1.0 μ M 存在下で CPE は観察されなかったが、AZT 0.1 μ M を含む培養液中では強い CPE が観察された。さらに、AZT 投与開始後6カ月が経過した時点の分離株043-2は、AZT 0.1 μ M あるいは1.0 μ M を含む培養液中で強い CPE が観察された。AZT の投与は18カ月継続され、ddI 投与に切り替えられた。AZT 長期投与後 ddI 投与3カ月経過と13カ月経過時点での分離株043-4と043-5株は、いずれも AZT 0.1 μ M あるいは AZT 1.0 μ M を含む培養液中でも強い CPE が観察された。CPE の観察された培養上清からはい

Table 3 Detection of HIV-1 p24 antigen in supernatant of cultures

HIV-1 isolate	Duration of drug therapy (months)		Concentration of AZT		
	AZT	ddI	0	0.1 μ M	1.0 μ M
005	0	0	>2.000*	0.080	0.083
005-3	2	0	>2.000	0.086	0.078
005-5	12	→ 1.5	>2.000	>2.000	>2.000
005-6	12	→ 6	>2.000	>2.000	>2.000
005-7	12	→ 12	>2.000	>2.000	>2.000
005-8	12	→ 15	>2.000	>2.000	0.432
043	2	0	>2.000	>2.000	0.116
043-2	6	0	>2.000	>2.000	>2.000
043-4	18	→ 3	>2.000	>2.000	>2.000
043-5	18	→ 13	>2.000	>2.000	>2.000
091	14	→ 0	>2.000	>2.000	>2.000
091-3	14	→ 11	>2.000	>2.000	>2.000
PBMC**			0.077	0.077	0.083

*Absorbance of culture supernatant. (Cutoff=0.128)

**PBMC was used in this assay.

いずれも吸光度 2 以上で p24 抗原が検出された。

症例 091: 初回分離 (091 株) 時点ですでに AZT 投与 14 カ月が経過しており, この直後から ddI の投与に切り替えられた。091 株と 091-3 株 (ddI 投与開始後 11 カ月経過時点での分離株) は, いずれも AZT 0.1 μ M あるいは AZT 1.0 μ M を含む培養液中でも強い CPE が観察され, 培養上清からはいずれも吸光度 2 以上で p24 抗原が検出された。

症例 005: AZT あるいは ddI のいずれの薬剤も投与を受けていない時点で分離された 005 株は, AZT を含まない培養液中では, 巨細胞を形成する CPE が観察されたが, AZT を含む培養液中では, CPE は観察されなかった。AZT 投与開始後 2 カ月の時点で分離された 005-3 株も AZT を含む培養液中では CPE は観察されなかった。AZT の投与は 12 カ月継続され ddI 投与に切り替えられた。AZT 長期投与後 ddI 投与 1.5 カ月経過と 6 カ月経過時点での分離株 005-5 と 005-6 株は, いずれも AZT 0.1 μ M あるいは AZT 1.0 μ M を含む培養液中でも強い CPE が観察された。しかしながら, ddI の投与が 12 カ月を経過した時点での分離株 005-7 では, AZT 0.1 μ M を含む培養液中では強い CPE が観察されたものの, AZT 1.0 μ M を含む培

養液中の CPE は弱いものであった。さらに ddI の投与が 15 カ月を経過した時点での分離株 005-8 は, AZT 0.1 μ M を含む培養液中では同様に強い CPE が観察されたが, AZT 1.0 μ M を含む培養液中では CPE が観察されなかった。これらの培養上清中の p24 抗原は, 強い CPE の観察されたところでは, 吸光度がいずれも 2 以上で p24 抗原が検出された。また, CPE の弱かった 005-7 株 AZT 1.0 μ M 存在下培養上清でも吸光度 2 以上で p24 抗原が検出された。一方, 005 株と 005-3 株で CPE の観察されなかった培養上清の吸光度はいずれもカットオフ (0.128) 以下で p24 抗原は検出されなかった。しかし, CPE の観察されなかった 005-8 株の AZT 1.0 μ M 存在下での培養上清の吸光度は 0.432 とカットオフよりもやや高く, p24 抗原が少量検出された。

考 察

前報⁹⁾において我々は, AZT の投与を受けている日本人の HIV 感染者から AZT に耐性を示す HIV 株が分離されることを報告した。

今回 AZT 投与が長期化し, AZT 耐性変異株の出現により, AZT 投与による臨床症状の改善が認められなくなったため ddI 投与に切り替えられた患者から経時的に分離した HIV 株について AZT に対する感受性試験を行い, AZT 投与中止後の AZT 耐性変異株の動向を追跡調査した。

今回の結果においても AZT の投与を受けていない時点での分離株では AZT を含む培養液中で CPE は観察されず, 培養上清中の p24 抗原も検出されなかったが, AZT 投与期間が 2 カ月を経過した時点で分離された HIV 株では, AZT 0.1 μ M を含む培養液中で増殖できる株とできない株が存在し, さらに AZT 投与期間が 6 カ月以上経過した時点で分離された HIV 株は, いずれも AZT 1.0 μ M 存在下でも増殖が可能であった。このように, AZT の投与が長期化するとともに, 次第に強い耐性を示す HIV 株が優勢に増殖してくることを明らかにできた。

AZT 長期 (12~18 カ月) 投与後 ddI 投与に切り替えられてからは, 症例 091 では AZT 投与中止後 ddI 投与 11 カ月, 症例 043 では AZT 投与中止後

ddI 投与13カ月が経過した時点で分離された株においても、AZT 0.1 μ M あるいは1.0 μ M を含む培養液中でCPEが観察され、培養上清中p24抗原も検出された。このように、AZTの投与を中止してddIの投与に切り替えて最長13カ月後に分離されたHIV株においても、AZTに耐性を示す株が優勢に増殖していることが確認された。

しかしながら、症例005において、AZT投与中止後ddI投与12カ月が経過した時点で分離された005-7株はAZT 0.1 μ M存在下では強いCPEを示したものの、AZT 1.0 μ M存在下ではCPEが弱く、さらにAZT投与中止後ddI投与15カ月が経過した時点で分離された005-8株はAZT 1.0 μ M存在下ではCPEが観察されず、培養上清中のp24抗原検出量も少量であった。この例では、AZT投与中止後ddI投与長期経過時点で分離されたHIV株は、AZT 1.0 μ M存在下では増殖できないような株が優勢となっていることが確認された。

Clairら¹⁰⁾はAZT長期投与後ddIに切り替えてから経時的に分離したHIVのAZTあるいはddIに対する感受性について報告している。それによると、AZTからddI投与に切り替えてから6カ月から12カ月の間に分離されたHIVは、ddI投与以前の分離株と比較して、ddIに対するIC₅₀が上昇し、AZTに対するIC₅₀が下降している。このようなHIV株は、AZT耐性に最も重要に関与していると思われる逆転写酵素遺伝子内の215番目のアミノ酸スレオニンのチロシンへの変異とともに、74番目のアミノ酸ロイシンのバリンへの変異が共通してみられることを示している。同様の変異についてShirasakaら¹¹⁾も報告している。

今後、AZT投与中止後のddI投与期間が、さらに長期化した時点での分離HIV株のAZTあるいはddIに対する感受性の動態および逆転写酵素にみられる変異等についてさらに検討して行きたい。

文 献

- 1) Mitsuya, H., Weinhold, K.J., Furman, P.A., Clair, M.H., Lehrman, S.N., Gallo, R.C., Bolognesi, D., Barry, D.W. & Broder, S.:

3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 7096-7100, 1985.

- 2) Mitsuya, H. & Broder, S.: Inhibition of the *in vitro* infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83: 1911-1915, 1986.
- 3) Fischl, M.A., Richman, D.D., Grieco, M.H., Gottlieb, M.S., Volberding, P.A., Laskin, O.L., Leedom, J.M., Groopman, J.E., Mildvan, D., Schooley, R.T., Jackson, G.G., Durack, D.T., King, D. & The AZT Collaborative Working Group: The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. N. Engl. J. Med., 317: 185-191, 1987.
- 4) Lambert, J.S., Seidlin, M., Reichman, R.C., Plank, C.S., Lavery, M., Morse, G.D., Knupp, C., McLaren, C., Pettinell, C., Valentine, F.T. & Dolin, R.: 2',3'-dideoxyinosine (ddI) in patients with the acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. N. Engl. J. Med., 322: 1333-1340, 1990.
- 5) Richman, D.D., Fischl, M.A., Grieco, M.H., Gottlieb, M.S., Volberding, P.A., Laskin, O.L., Leedom, J.M., Groopman, J.E., Mildvan, D., Hirsch, M.S., Jackson, G.G., Durack, D.T., Nusinoff-Lehrman, S. & The AZT Collaborative Working Group: The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. N. Engl. J. Med., 317: 192-197, 1987.
- 6) Yarchoan, R., Mitsuya, H., Thomas, R.V., Pluda, J.M., Hartman, N.R., Perno, C.F., Marczyk, J.M., Allain, J.P., Johns, D.G. & Broder, S.: *In vivo* activity against HIV and favorable toxicity profile of 2',3'-dideoxyinosine. Science, 245: 412-415, 1989.
- 7) Larder, B.A., Darby, G. & Richman, D.D.: HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. Science, 243: 1731-1734, 1989.
- 8) Japour, A.J., Chatis, P.A., Eigenrauch, H.A. & Crumpacker, C.S.: Detection of human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates with reduced sensitivity to zidovudine and dideoxyinosine by RNA-RNA hybridization.

- Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 3092-3096, 1991.
- 9) 斎藤隆行, 近藤真規子, 伊藤 章, 長尾 大, 今井光信: Azidothymidine (AZT)投与患者から分離された Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1)の AZT 感受性に関する検討. 感染症誌, 67: 311-314, 1993.
- 10) Clair, M.H., Martin, J.L., Tudor-Williams, G., Bach, M.C., Vavro, C.L., King, D.M., Kellam, P., Kemp, S.D. & Larder, B.A.: Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. Science, 253: 1557-1559, 1991.
- 11) Shirasaka, T., Yarchoan, R., O'Brien, M.C., Husson, R.N., Anderson, B.D., Kojima, E., Shimada, T., Broder, S. & Mitsuya, H.: Changes in drug sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 during therapy with azidothymidine, dideoxycytidine, and dideoxyinosine: An *in vitro* comparative study. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90: 562-566, 1993.

Investigation of AZT Susceptibility of Sequential HIV-1 Isolates from Patients Treated with ddI after Long-term Therapy with AZT

Takayuki SAITO¹⁾, Makiko KONDO¹⁾, Akira ITO²⁾, Takeshi NAGAO³⁾, Takako HAYASHI¹⁾, Sumi WATANABE¹⁾ & Mitsunobu IMAI¹⁾

¹⁾Department of Virology, Kanagawa Prefectural Public Health Laboratories

²⁾Division of Clinical Laboratory, Yokohama City University, School of Medicine

³⁾Department of Hematology, Kanagawa Children's Medical Center

AZT susceptibility of sequential 12 HIV-1 isolates was investigated by culture method. These isolate were obtained from three patients who had received AZT for at least 12 months and switched to ddI after they appeared to deteriorate clinically. Cultures of isolate from a patient before therapy with AZT or ddI did not show cytopathic effect (CPE) in the presence of 0.1 μ M or 1.0 μ M AZT. Culture of 2 isolates from two patients treated with AZT more than 6 months before switched to ddI therapy showed CPE in the presence of AZT and HIV-1 p24 antigen was detected by ELISA in the supernatants. Culture of 6 of 7 isolates from three patients treated with ddI after long-term therapy with AZT also showed CPE in the presence of 1.0 μ M AZT and HIV-1 p24 antigen was detected. These results demonstrated that AZT-resistant variant was still a dominant population in the isolate from patients after 11 to 13 months of discontinuing AZT therapy.